动 物 学 研 究 2011，Feb. 32(1): 66−69 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2011.01066

野生中缅鼩病毒携带情况的初步调查

王新兴，李婧潇，王文广，孙晓梅，何春艳，代解杰*

(中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所，云南 昆明 650118)

摘要：病毒学检测和监测是树鼩实验动物化和质量控制的重要标准和依据，而野生中缅树鼩是否携带人兽共患病毒鲜见报道。本研究采用酶联免疫吸附(ELISA)方法，对来源于云南昆明市城郊青龙峡地区的野生树鼩是否携带单纯疱疹病毒、轮状病毒、流感病毒、柯萨奇病毒、甲肝病毒、乙肝病毒、丙肝病毒、丁肝病毒、登革热病毒、出血热病毒和麻疹病毒等 11 种常见病毒进行筛查。结果表明，在已筛查的 60 只野生中缅树鼩中，可检测到单纯疱疹病毒和柯萨奇病毒，其血清抗体阳性比例分别为 36.7% (22/60) 和 1.67% (1/60)，而在粪便中仅检测到轮状病毒，其抗原阳性为 6.7% (4/60)，未检测到其他病毒，初步显示了野生树鼩自然状态下携带病毒的状况。为此，建议将单纯疱疹病毒、柯萨奇病毒和轮状病毒列为普通级树鼩病毒质量控制的首检项目，进一步大样本筛查将显示是否将其他病毒列为必检项目。

关键词：中缅树鼩；病毒监测；酶联免疫吸附试验
中图分类号：Q95-33; R373; Q959.832 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2011)01-0066-04

Preliminary investigation of viruses to the wild tree shrews (*Tupaia belangeri chinese*)

WANG Xin-Xing, LI Jing-Xiao, WANG Wen-Guang, SUN Xiao-Mei, HE Chun-Yan, DAI Jie-Jie*

(*Institute of Medical Biology*, *Chinese Academy of Medical Sciences/Peking Union Medical College*, *Kunming Yunnan* 650118, *China*)

Abstract: Virological testing and monitoring is a fundamental part of quality control of experimental animals. However, there are few papers regarding the spectrum and status of natural infection in wild tree shrews with human and animal pathogenic viruses. Using enzyme-linked immunosorbent adsorption assay (ELISA), we tested sixty wild tree shrews captured from Qinglong, an outskirt region of Kunming, Yunnan Province, China for eleven viruses, including herpes simplex virus, coxsackie virus, influenza virus, HAV, HBV, HCV, HDV, dengue virus, hemorrhagic fever virus and measles virus. Our results showed that, in the serum samples, 22/60 (36.7%) and 1/60 (1.67%) were antibody positive for herpes simplex virus and coxsackie virus, respectively, and 4/60 (6.7%) were antigen positive for rotavirus in the feces. The remaining species of viruses were negative in these tree shrews. Based on these results, we propose that herpes simplex virus, coxsackie virus and cotavirus should be listed as top priority for routine virological monitoring of tree shrews.

Key words: Tree shrew (*Tupaia belangeri chinese*); Viruses; Virological monitoring; ELISA

树鼩 (*Tupaia belangeri*, tree shrew)是一种形似松鼠的小型哺乳动物，主要生活于热带和亚热带森林、灌丛、村落附近，在东南亚和我国的云南、广西、海南、贵州等地有较多分布。树鼩在进化地位上介于灵长目和食虫目之间，曾被划分为原始灵长类动物，在新陈代谢和大体解剖上比犬、鼠等实验动物更接近人类，可以罹患多种人类疾病，并具有体形小，繁殖快，经济低廉，易驯养和饲育等优点，因此，作为一种新型的实验动物资源正在越来越受到重视 (Xu et al, 2005)。

目前国内科研所使用的树鼩多为野外捕获，实验动物的质量难以保证，其自然携带病毒尚不清楚，

收稿日期：2010-12-01；接受日期：2011-01-26
基金项目："十一五"国家科技支撑重点计划项目(2009BAI83b02)；云南省科技基础条件平台建设计划项目(2006PT07-2)
*通讯作者(Corresponding author), E-mail: djj@imbcams.com.cn
第一作者简介：王新兴(1986–)，男，硕士研究生，研究方向：医学实验动物学；E-mail：wxxing666@163.com

而许多情况下这些病毒对试验又存在干扰，所得到实验结果的可比性、准确性、可重复性等问题有待商榷。将野生树鼩进行人工驯化、饲养、繁殖与规范化管理，对其携带的微生物学、寄生虫学和病毒学指标进行控制，建立达到质量标准的树鼩种群，使其成为新的实验动物品种势在必行 (He, 2010)。目前树鼩人工驯化以及繁育的关键技术已经解决，对树鼩病毒的质量控制却仍是一项重要的内容。确立普通级树鼩的病毒检测标准，首先应排除人兽共患病，因其不仅会对动物的健康和实验结果造成影响，而且会对实验动物工作者和动物实验人员的人身健康和生命安全造成威胁。本研究参考啮齿类、家兔和灵长类动物等实验动物病毒检测国家标准 (GB14922-94[S] 和 GB/T14926.1-14926.41-94[S])，结合已报道的树鼩研究文献资料，选取了 11 种人兽共患病病毒，对从昆明青龙峡地区捕获的的 60 只野生中缅树鼩，进行病毒携带状况的调查，可为今后树鼩实验动物化的质量控制标准和病毒检测指标的建立提供参考。

1　材料与方法

1.1　实验材料

1.1.1　实验动物

从云南昆明青龙峡地区捕获的野生树鼩随机挑选 60 只，雌雄数目各 30 只。在分类学上属于中缅树鼩滇西亚种 (*Tupaia belangeri chinese*)，。

1.1.2　主要仪器

37°恒温箱、高速冷冻离心机(SIGMA 3K30)、酶标仪(Bio Tek Power Wave XS2)、精密移液器等。

1.1.3　试剂盒

乙肝表面抗原、e 抗原检测试剂盒、丙肝抗体检测试剂盒(KHB 上海科华生物工程股份有限公司)；柯萨奇病毒、甲肝病毒、丁肝病毒、登革热病毒、流感病毒和麻疹病毒抗体 IgG 酶联免疫分析试剂盒 (美国 R&D 公司)；出血热病毒 (中国药品生物制品检定所)；优生优育“TORCH”项目 HSV(1+2 型) IgM 抗体一步法酶联免疫试剂盒、轮状病毒抗原检测盒 (深圳市安群生物工程有限公司)。

1.2　实验方法

1.2.1　标本采集及处理

采集 60 只野生树鼩的血标本，从尾静脉或股动脉采血 1.5 mL，37℃恒温箱静置约 3 h，高速离心机 6000 r/min 离心 15 min。将分离后的血清进行合理分装，保证每次检测所需的最小血清量，并放入 –20℃冰箱保存待检，避免反复冻融；用无菌 Eppendorf 小管收集 60 只野生树鼩的粪便，加人 PBS 缓冲液配成 20% 悬液，经 4500 r/min 离心 20 min，取上清液用于轮状病毒的检测。

1.2.2　诊断试剂盒检测

严格按照各个试剂盒的说明书进行操作。

1.2.3　数据读取及分析处理

完成操作后，经 Bio Tek Power Wave XS2 酶标仪进行检测，应用 Gen5 连续酶标分析软件进行数据分析和处理。根据说明书提供的结果判定标准，判断实验的有效性和每个样本的阴阳性，并记录。

2　结　果

2.1　血液标本的检测结果

单纯疱疹病毒抗体有 22 例呈阳性，阳性率为 36.7% (22/60)；柯萨奇病毒抗体出现 1 例阳性，阳性率为 1.67% (1/60)；流感病毒、甲肝病毒、乙肝病毒、丙肝病毒、丁肝病毒、登革热病毒、出血热病毒、麻疹病毒等 7 种病毒的检测结果全为阴性，见表 1。

表 1　野生树鼩血清病毒检测结果

Tab. 1　The results of virus antibody in wild tree shrew

病毒名称 Virus names	样本总数 Total samples	阳性例数 Positive number	阳性率(%) Positive rate
单纯疱疹病毒 Herpes simplex virus	60	22	36.7
流感病毒 Influenza virus	60	0	0
柯萨奇病毒 Coxsackie virus	60	1	1.67
甲肝病毒 Hepatitis A virus	60	0	0
乙肝病毒表面抗原 Hepatitis B virus surface antigen	60	0	0
乙肝病毒 e 抗原 Hepatitis B virus e antigen	60	0	0
丙肝病毒 Hepatitis C virus	60	0	0
丁肝病毒 Hepatitis D virus	60	0	0
登革热病毒 Dengue virus	60	0	0
出血热病毒 Hemorrhagic fever virus	60	0	0
麻疹病毒 Measles virus	60	0	0

2.2 粪便标本的检测结果

对轮状病毒采用粪便标本检测抗原, 60 份样本中 4 例呈阳性, 阳性率为 6.7% (4/60), 见表 2。

表 2 野生树鼩粪便病毒抗原检测结果
Tab. 2 The results of viral antigens in wild tree shrew feces

病毒名称 Virus names	样本总数 Total samples	阳性例数 Positive number	阳性率 (%) Positive rate
轮状病毒 Rotavirus	60	4	6.7

3 讨 论

3.1 树鼩在病毒学中的应用

随着非人灵长类实验动物资源的日益稀贵和实验动物小型化的发展趋势, 树鼩作为新兴的动物实验对象, 在人类重大疾病和重大传染病研究领域已经呈现广泛的前景, 尤其是在病毒性疾病方面。近半个世纪以来, 国内外陆续有对树鼩疱疹病毒、登革热病毒、肝炎病毒、轮状病毒、单纯疱疹病毒、登革热病毒等病毒的易感性研究 (Hu & Li, 2002), 但这些是人工感染状态下的研究，而野生树鼩是否会自发感染这些人兽共患病值得调查。从本研究结果来看, 单纯疱疹病毒、轮状病毒和柯萨奇病毒发现了阳性结果, 提示这 3 种病毒在树鼩自然种群中的存在感染状况。Wan et al (1982, 1985) 用含有轮状病毒的患儿的粪便灌注给笼养成年树鼩, 观察其发病情况、病理学、病原学和血清学，发现成年树鼩可感染人轮状病毒, 其可能是一种人轮状病毒易感的动物。此研究有助于轮状病毒性感染的发病和免疫机理、药物筛选以及疫苗制备和检定的研究, 从而加快控制轮状病毒感染的进程。Daral et al (1980) 用Ⅰ型与Ⅱ型单纯疱疹病毒 (HSV-1, HSV-2) 感染树鼩, 发现幼龄树鼩对 HSV 易感, 感染后出现了类似疱疹病毒肝炎的表现, 肝脏与脾脏出现高滴度的病毒。随后他们发现成年树鼩也可感染 HSV 而发病, 但对某些毒株有抵抗力, 并且感染 HSV 后存活的动物则可不再第二次感染 (Hu & Li, 2002)。本研究结果可与上述文献报道相呼应, 而目前尚未见树鼩人工感染柯萨奇病毒的研究, 其易感性也尚不明确。

3.2 树鼩病毒检测问题

目前研究发现, 树鼩有望成为良好的病毒性肝炎动物模型 (Chen et al, 2008)。因此, 作者对树鼩进行 4 种肝炎病毒的筛查, 但是都未发现阳性结果。其余几种病毒的筛查结果也为阴性。这可能与样本量较小、野生中缅树鼩来源地单一等因素有关, 从流行病学角度上讲, 并不能有效说明野生中国树鼩对这几种病毒易感性问题和感染率状况。

从方法学上来看, 采用 ELISA 方法对树鼩携带的病毒进行检测, 简便快捷, 并具有可应用于大批常规检测的特点, 是实验动物病毒检测国家标准推荐的血清学检测方法之一。但由于 ELISA 检验方法本身固有的局性, 以及实验所采用的试剂盒均为人的病毒检测商品试剂盒 (目前尚未研发出针对树鼩的病毒检测试剂盒), 其检测结果的特异性和准确性有待进一步完善。提高 ELISA 方法的特异性和灵敏度, 研发标准化的树鼩病毒检测试剂盒将是重要的研究内容。

总之, 建立实验动物化的树鼩病毒检测标准, 一方面要更广泛的调查树鼩的病毒感染状况和流行病学调查; 另一方面, 要建立树鼩实验动物化的病毒检测的方法和技术标准, 并不断提高检测方法的灵敏性和特异性，对树鼩以新型实验动物角色在生物医学研究和人类健康领域发挥更大作用具有重要的意义。

参考文献:

Chen J, Dai JJ, Sun XM. 2008. Advances in the use of tree shrews as animal models for hepatitis research[J]. *Chin J Compar Med*， 18(2): 59-62. [陈瑾, 代解杰, 孙晓梅. 2008. 树鼩肝炎动物模型的研究进展.中国比较医学杂志. 18(2): 59-62.]

Daral G, Zöller L, Matz B, Schwaier A, Flügel RM, Munk K. 1980. Experimental infection and the state of viral latency of adult *Tupaia* with herpes simplex virus tape 1 and 2 and infection of juvenile *Tupaia* with temperature-sensitive mutants of HSV type 2[J]. *Arch Virol*, 65: 311-318.

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 2002. GB/T14926.1-14926.41-2001[S]. 实验动物微生物学检验方法. 北京：中国国家标准化管理委员会.

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 2002. GB14922.2-2001[S]. 实验动物微生物学等级及监测. 北京：中国国家标准化管理委员会.

He ZM. 2010. Potentials and prospects: Laboratory animal derived from resource animals in China[J]. *Chin J Compar Med*, 20(3): 1-7. [贺争鸣. 2010. 我国资源动物的实验动物化潜力与展望. 中国比较医学杂志, 20(3): 1-7.]

Hu XL, Li JQ. 2002. Application of *Tupaia* on studying of virus disease[J].

Virol Sin, 17(3): 276-278. [胡溪柳, 李际强. 2002. 树鼩应用于病毒学方面的研究进展. 中国病毒学, 17(3): 276-278.]

Wan XB, Pang QF, Qiu FX, Xu AY, Zhang SQ. 1982. Experimental infection of human rotavirus of adult tree shrew[J]. *J Med Res*, **3**: 2. [万新邦, 庞其方, 丘福禧, 胥爱源, 张胜泉. 1982. 人轮状病毒实验感染成年树鼩的研究. 医学研究杂志, **3**: 2.]

Wan XB, Pang QF, Qiu FX, Zhang XS, Liu JC, Xv AY, Zhang SQ, Zhang HF, Xu WM..1985.Experimental studies on the susceptibility of adult *Tupaia belangeri yunalis* to human rotavirus[J].*Chin J Microbiol Immunol*,**5**:304-307.［万新邦, 庞其方, 丘福禧, 张新生, 刘玑昌, 胥爱源, 张胜泉, 张惠芬, 徐维民.1985.成年的中国云南树鼩对人轮状病毒易感性的实验研究. 中华微生物学和免疫学杂志, **5**:304-307.］

Xu XP, Chen HB, Ben KL. 2005. Application of tree shrew as an animal model in biomedical research[J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 13(3): 187-190. [徐新平, 陈红波, 贲昆龙. 2005. 树鼩在医学生物学中的应用. 中国实验动物学报, 13(3): 187-190.]